

PCT/JP 99/06016

29.10.99

日 本 国 特 許 庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 20 DEC 1999

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

JP 99/6016

出 願 年 月 日

Date of Application:

1998年11月19日

出 願 番 号

Application Number:

平成10年特許願第329272号

出 願 人

Applicant(s):

第一製薬株式会社

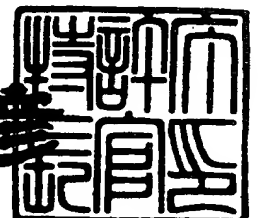
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年12月 3日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特平11-3083839

【書類名】 特許願

【整理番号】 98260M

【提出日】 平成10年11月19日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明の名称】 DDS化合物の測定方法

【請求項の数】 14

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬株式会社東京研究開発センター内

    【氏名】 塩瀬 能伸

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬株式会社東京研究開発センター内

    【氏名】 久我 洋

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬株式会社東京研究開発センター内

    【氏名】 是永 博

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬株式会社東京研究開発センター内

    【氏名】 井上 和泓

【特許出願人】

    【識別番号】 000002831

    【氏名又は名称】 第一製薬株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100096219

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 今村 正純

【選任した代理人】

【識別番号】 100095843

【弁理士】

【氏名又は名称】 釜田 淳爾

【選任した代理人】

【識別番号】 100092635

【弁理士】

【氏名又は名称】 塩澤 寿夫

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成10年特許願第310130号

【出願日】 平成10年10月30日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 038357

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 DDS化合物の測定方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ペプチド結合した 2～8 個のアミノ酸を含むスパーサーを介して高分子キャリアーと医薬化合物の残基とが結合した DDS化合物の測定方法であって、該 DDS化合物をペプチダーゼで処理することにより得られる加水分解物を測定する工程を含む方法。

【請求項2】 生体試料中に含まれる該 DDS化合物の濃度測定に用いる請求項1に記載の方法。

【請求項3】 該 DDS化合物に導入された医薬化合物残基の含有量を測定するために用いる請求項1に記載の方法。

【請求項4】 該加水分解物が医薬化合物である請求項1ないし3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】 該加水分解物が医薬化合物残基にスパーサーの一部が結合した化合物である請求項1ないし3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】 スパーサーの一部がスパーサー由来の1個のアミノ酸である請求項5に記載の方法。

【請求項7】 該高分子キャリアーがカルボキシル基を有する多糖誘導体である請求項1ないし6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】 該高分子キャリアーがカルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールである請求項7に記載の方法。

【請求項9】 該 DDS化合物中に導入された医薬化合物が抗腫瘍剤又は抗炎症剤である請求項1ないし8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】 スパーサーがN末端側から-Gly-Gly-Phe-Gly-で表されるテトラペプチドである請求項1ないし9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】 ペプチダーゼが $\alpha$ -キモトリプシンである請求項1ないし10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項12】 医薬化合物が (1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インド

リジノ [1,2-b] キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンである請求項 1 ないし 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】 N 末端側から-Gly-Gly-Phe-Gly-で表されるテトラペプチドを含むスパーサーを介してカルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールと (1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ [de] ピラノ [3',4':6,7] インドリジノ [1,2-b] キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンとが結合した DDS 化合物の測定に用いる請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】 ペプチダーゼとして  $\alpha$ -キモトリプシンを用い、加水分解物として (1S,9S)-9-エチル-5-フルオロ-1-グリシルアミノ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ [de] ピラノ [3',4':6,7] インドリジノ [1,2-b] キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンを測定する請求項 13 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、高分子キャリアーと抗腫瘍剤などの医薬化合物とを結合させた DDS 化合物の測定方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

肺癌や消化器癌などの固形癌や白血病などの血液癌の治療に際して用いられる抗腫瘍剤は、静脈内投与や経口投与などの投与経路により全身的に投与された後、特定の腫瘍部位に移行して癌細胞の増殖を阻害ないし抑制することにより治療効果を発揮する。しかしながら、全身投与された抗腫瘍剤は、血中から肝臓・網内系臓器に速やかに取り込まれたり、あるいは速やかに尿中排泄されるために、血中濃度が低下して腫瘍部位への移行が制限される場合がある。また、通常の抗腫瘍剤自体では腫瘍部位への移行選択性（腫瘍選択性）が低いために、抗腫瘍剤が全身の様々な細胞や組織に満遍なく分布してしまい、正常な細胞や組織に対しても細胞毒として作用するので、嘔吐、発熱、あるいは脱毛などの副作用を極めて高率に発生させるという問題がある。従って、抗腫瘍剤を効率的かつ選択的に腫

瘍部位に移行させる手段の開発が求められている。

【0003】

このような手段の一つとして、カルボキシル基を有する多糖誘導体などの高分子キャリアーに対して抗腫瘍剤を結合させて抗腫瘍剤の血中における消失を遅延させるとともに、癌組織への指向性を高める方法が提案されている。例えば、国際公開 W094/19376 号には、カルボキシル基を有する多糖誘導体のカルボキシル基にペプチド鎖（アミノ酸数 1～8）が結合されており、さらにこのペプチド鎖を介してドキソルビシン、ダウノルビシン、マイトマイシンC、又はブレオマイシンなどを結合したDDS（ドラッグ・デリバリー・システム）に適する化合物（以下、本明細書において「DDS化合物」という。）が開示されている。また、特公平7-84481号公報には、カルボキシメチル化されたマンノグルカン誘導体にシッフ塩基や酸アミド結合を介して上記の抗腫瘍剤を導入したDDS化合物が開示されている。これらのDDS化合物は、高分子キャリアーに結合された抗腫瘍剤自体に比べてより優れた抗腫瘍効果を有するとともに、毒性・副作用が軽減されていることを特徴としている。

【0004】

その他、ポリアルコール化多糖誘導体を高分子キャリアーとして用いたDDS化合物に関する技術については、「多糖-ペプチド-ドキソルビシン複合体に関する研究・高分子キャリアーの血中安定性と抗腫瘍効果の関係」（第10回日本DDS学会講演要旨集，279，1994）；「多糖-ペプチド-ドキソルビシン複合体に関する研究・体内動態と抗腫瘍効果」（第9回日本薬物動態学会年会講演要旨集，292，1994）；第19回研究開発動向セミナー（医薬品機構主催）要旨集，D-9，1995；及び「高分子キャリアーによる腫瘍への薬物送達に関する研究」（第12回コロイド・界面技術シンポジウム，日本化学会，講演要旨集，51，1995）などの報告がある。

【0005】

DDS化合物を臨床で使用する場合には、DDS化合物自体の血中濃度を正確に測定することが必要であり、また、適正な投与量を決定したり、製品のロット差を検定するためには、DDS化合物中に導入された抗腫瘍剤などの医薬化合物残

基の含有量を正確に測定する必要がある。従来、DDS化合物の血中濃度の測定やDDS化合物の医薬化合物残基の含有量測定は、医薬化合物の発する蛍光やUV吸収を指標にして、DDS化合物より医薬化合物またはこれにスパーサーの一部が結合した化合物を切り離すことなく、DDS化合物自体を直接測定することにより行われている。また、DDS化合物自体のNMR測定による方法や、DDS化合物を酸処理して生じる分解物を測定する方法も提案されている。しかしながら、医薬化合物が酸に対して不安定である場合には、酸処理等による分解物の定量法を利用することはできず、NMR測定による定量は精度が低いという問題がある。また、DDS化合物に存在する医薬化合物残基のUV吸収は、高分子キャリアーやペプチドスパーサーから受ける影響により、医薬化合物自体に比べて極大波長がシフトしたりモル吸光係数が変化している場合があるため、DDS化合物中に導入された医薬化合物残基の含有量を正確に測定することは一般に困難である。さらに、生体に投与された組織中のDDS化合物をNMR測定による方法やUV吸収により定量することは極めて困難である。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、高分子キャリアーと医薬化合物の残基とがオリゴペプチドを含むスパーサーを介して結合したDDS化合物の測定方法を提供することにある。より具体的には、本発明の課題は、DDS化合物自体、又はDDS化合物中に導入された抗腫瘍剤などの医薬化合物残基の含有量を正確に測定する方法を提供することにある。さらに具体的には、投与されたDDS化合物の血中濃度や組織内濃度を正確に定量することができ、あるいはDDS化合物に導入された医薬化合物残基の含有量を正確に定量可能な測定方法を提供することが本発明の課題である。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意努力した結果、上記DDS化合物をペプチダーゼで処理することにより得られる加水分解物を測定すると、DDS化合物の血中濃度やDDS化合物に導入された医薬化合物残基の含有量を正確に、か

つ簡便に定量することができることを見出した。本発明は上記の知見を基にして完成されたものである。

#### 【0008】

すなわち本発明は、ペプチド結合した 2~8 個のアミノ酸を含むスパーサーを介して高分子キャリアーと医薬化合物の残基とが結合した DDS 化合物の測定方法であって、該 DDS 化合物をペプチダーゼで処理することにより得られる加水分解物を測定する工程を含む方法を提供するものである。この発明の好ましい態様によれば、生体試料中に含まれる該 DDS 化合物の濃度測定に用いる上記方法；該 DDS 化合物に導入された医薬化合物残基の含有量を測定するために用いる上記方法；該加水分解物が医薬化合物である上記方法；該加水分解物が医薬化合物残基にスパーサーの一部が結合した化合物である上記方法；及び、スパーサーの一部がスパーサー由来の 1 個のアミノ酸を含む医薬化合物である上記方法が提供される。

#### 【0009】

上記発明のさらに好ましい態様によれば、該高分子キャリアーがカルボキシル基を有する高分子キャリアー、好ましくは多糖誘導体である上記方法；該高分子キャリアーがカルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコール、好ましくはカルボキシメチルデキストランポリアルコールである上記方法；カルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールを構成するデキストランポリアルコールが、実質的に完全にポリアルコール化可能な条件下でデキストランを処理して得られたデキストランポリアルコールであることを特徴とする上記方法；該高分子キャリアーが糖化合物で修飾されたものである上記方法；該 DDS 化合物中に導入された医薬化合物が抗腫瘍剤又は抗炎症剤である上記方法；スパーサーが N 末端側から-Gly-Gly-Phe-Gly-で表されるテトラペプチドである上記方法；ペプチダーゼが  $\alpha$ -キモトリプシンである上記方法；及び、医薬化合物が (1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンである上記方法が提供される。

#### 【0010】



上記発明の特に好ましい態様では、上記方法はN末端側から-Gly-Gly-Phe-Gly-で表されるテトラペプチドを含むスペーサーを介してカルボキシC<sub>1-4</sub>アルキルデキストランポリアルコールと(1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンとが結合したDDS化合物の測定に用いることができ、ペプチダーゼとして $\alpha$ -キモトリプシンを用い、加水分解物として(1S,9S)-9-エチル-5-フルオロ-1-グリシルアミノ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンを測定することにより、上記DDS化合物又は上記DDS化合物に導入された上記抗腫瘍剤の含有量を定量することができる。

【0011】

#### 【発明の実施の形態】

本明細書において用いられる「測定」という用語は、定量、定性などを目的として行われる測定を含めて、最も広義に解釈する必要があるが、好ましくは定量を意味している。本発明の測定方法の対象となるDDS化合物は、ペプチド結合した2～8個のアミノ酸を含むスペーサーを介して高分子キャリアーと医薬化合物の残基とが結合した化合物である。ペプチド結合した2～8個のアミノ酸を含むスペーサーとしては、ペプチド結合した2～8個のアミノ酸のみからなるスペーサーのほか、ペプチド結合した2～8個のアミノ酸からなるオリゴペプチドに-NH-Y-CO-（式中、Yは炭素数1～8のアルキレン基又はフェニレン基などの連結基を示す）で表される連結基が結合したスペーサーなどを挙げることができる。本発明の測定方法は、例えば、血液や体液などの生体試料に含まれるDDS化合物自体の濃度を測定するために用いることができる。また、本発明の方法は、DDS化合物に導入された医薬化合物残基の導入量（例えば、DDS化合物全重量に対する医薬化合物残基の重量%など）を測定するために用いることができる。

【0012】

DDS化合物に含まれる医薬化合物の残基は、例えば、抗腫瘍剤、抗炎症剤、抗菌剤などの医薬としてヒトを含む哺乳類の病気の治療及び／又は予防に用いられる医薬化合物の主要な部分構造を意味している。もっとも、該医薬化合物の用途

は上記のものに限定されることはなく、医薬化合物としては、高分子キャリアー又はスペーサーとの結合に関与できる 1 又は 2 以上の反応性官能基（例えば、アミノ基、カルボキシル基、水酸基、チオール基、エステル基など）を有するものであればいかなるものを用いてもよい。医薬化合物残基は、高分子キャリアーのカルボキシル基、スペーサーの N 末端アミノ基若しくは C 末端カルボキシル基、又はスペーサーを構成するアミノ酸に存在する反応性官能基に結合していてもよい。また、本明細書において医薬化合物という場合には、それ自体が医薬作用を有する化合物の主要構造をその部分構造として含み、生体内で該化合物を再生することができるプロドラッグ化合物も含まれる。

## 【0013】

本明細書において、医薬化合物の残基とは、スペーサーと医薬化合物残基との結合が医薬化合物中の反応性官能基とスペーサー中の反応性官能基との反応（例えば脱水縮合など）により形成されたと仮定した場合において、結合後の化合物中に存在する医薬化合物に由来する部分構造のことである。例えば、医薬化合物が  $D-NH_2$ ,  $D-COOH$ ,  $D-COOR$ ,  $D-OH$ ,  $D-SH$ ,  $D-CONH_2$ ,  $D-NH-COOR$  (R は低級アルキル基等) で表される場合、医薬化合物の残基はそれぞれ  $D-NH-$  ( $D-NH-CO-Q$  など),  $D-CO-$  ( $D-CO-NH-Q$ ,  $D-CO-O-Q$ ,  $D-CO-S-Q$  など),  $D-CO-$  ( $D-CO-NH-Q$ ,  $D-CO-O-Q$ ,  $D-CO-S-Q$  など),  $D-O-$  ( $D-O-CO-Q$ ,  $D-O-Q$  など),  $D-S-$  ( $D-S-CO-Q$ ,  $D-S-Q$  など),  $D-CONH-$  ( $D-CO-NH-CO-Q$  など),  $D-NH-CO-$  ( $D-NH-CO-O-Q$ ,  $D-NH-CO-NH-Q$  など) で表される (カッコ内はスペーサーと医薬化合物残基との結合を示し、Q はスペーサーから反応性官能基を除いた残りの部分構造を示す)。もっとも、スペーサーと医薬化合物残基との結合の種類は上記のものに限定されることはない。

## 【0014】

医薬化合物の残基としては、例えば、ドキソルビシン、ピラルビシン、メルファラン、ダウノルビシン、マイトマイシン C、ブレオマイシン、シクロシチジン、ピンクリスチン、ピンブラスチン、メトトレキセート、白金系抗腫瘍剤 (シスプラチン若しくはその誘導体)、タキソール若しくはその誘導体、又はカンプトテシン若しくはその誘導体 (特開平 6-87746 号公報に記載された抗腫瘍剤、好ましくは請求項 2 に記載された (1S,9S)-1- アミノ-9- エチル-5- フルオロ-2,3- ジ

ヒドロ-9- ハイドロキシ-4- メチル-1H,12H-ベンゾ [de] ピラノ [3',4':6,7] イン  
ドリジノ [1,2-b] キノリン-10,13(9H,15H)- ジオン等) など、アミノ基又はカル  
ボキシル基を有する抗腫瘍剤の残基を好適に用いることができる。また、例えば  
、コハク酸ヒドロコルチゾン、コハク酸プレドニソロンなどのステロイド系抗炎  
症剤、又はメフェナム酸、フルフェナム酸、ジクロフェナク、イブプロフェン、  
チノリジンなどの非ステロイド系抗炎症薬の残基も好適である。

#### 【0015】

医薬化合物の残基はスペーサーを介して高分子キャリアーと結合するが、好まし  
いスペーサーは、ペプチド結合した2ないし8個のアミノ酸からなるオリゴペプ  
チドの残基 (N末端のアミノ基及びC末端のカルボキシル基からそれぞれ1個の  
水素原子及び1個の水酸基を除いた残基を意味する) の形態を有している。例え  
ば、2～6個のアミノ酸からなるオリゴペプチドの残基はスペーサーとして好適  
である。スペーサーを構成するアミノ酸の種類は特に限定されないが、例えば、  
L-又はD-アミノ酸、好ましくはL-アミノ酸を用いることができ、 $\alpha$ -アミノ酸の  
ほか、 $\beta$ -アラニン、 $\epsilon$ -アミノカプロン酸、 $\gamma$ -アミノ酪酸などを用いてもよ  
い。このような $\alpha$ -アミノ酸以外のアミノ酸は、スペーサー中で高分子キャリア  
ーに近接した位置に配置されることが好ましい。

#### 【0016】

オリゴペプチドスペーサーの結合方向は特に限定されないが、一般的には、高分  
子キャリアーがカルボキシル基を有する場合には、そのカルボキシル基にスペ  
ーサーのN末端を酸アミド結合によって結合し、医薬化合物のアミノ基にスペ  
ーサーのC末端を結合することできる。また、例えば、ペプチドスペーサーの構成単  
位としてリジン残基を含めておき、リジン残基の $\alpha$ -アミノ基及び $\epsilon$ -アミノ基  
をそれぞれ他のアミノ酸のカルボキシル基と酸アミド結合させると、ペプチドス  
ペーサーの両末端がN末端になるので、医薬化合物のカルボキシル基を結合する  
ことが可能になる。さらに、スペーサー中に1個又は2個以上のジアミン化合物  
またはジカルボン酸化合物の残基 (例えばエチレンジアミンなどのジアミンの残  
基やコハク酸などのジカルボン酸の残基など) を構成単位として含めておき、そ  
れぞれ両末端がN末端のスペーサー及び両末端がC末端のスペーサーを利用して

もよい。

【0017】

スペーサーに含まれるオリゴペプチドのアミノ酸配列は特に限定されないが、例えば、-X-Z-で表されるジペプチドの残基（Xは疎水性アミノ酸の残基を示し、Zは親水性アミノ酸の残基を示し、-X-Z-は疎水性アミノ酸(X)と親水性アミノ酸(Z)とがそれぞれN末端側及びC末端側となってペプチド結合したジペプチドのN末端のアミノ基及びC末端のカルボキシル基からそれぞれ1個の水素原子及び1個の水酸基を除いた残基を意味する）からなるスペーサー、又は該ジペプチド残基を部分構造として含むスペーサーを好適に用いることができる。疎水性アミノ酸としては、例えば、フェニルアラニン、チロシン、ロイシンなどを用いることができ、親水性アミノ酸としては、例えば、グリシン、アラニンなどを用いることができる。スペーサーがこのようなジペプチド残基の繰り返し配列（例えば-X-Z-X-Z-、-X-Z-X-Z-X-Z-など）を有していてもよい。

【0018】

このようなジペプチド構造を含むスペーサーを用いると、本発明の方法に従ってDDS化合物がペプチダーゼにより容易に加水分解され、高い測定感度と測定精度を達成することができる。また、ペプチダーゼが豊富であると考えられる腫瘍部位や炎症部位で上記スペーサー部分が速やかに加水分解され、当該部位においてDDS化合物から短時間に高濃度の医薬化合物が遊離される。医薬化合物の残基として、濃度に依存型の抗腫瘍剤（例えばドキソルビシンなど）の残基を用いる場合には、-X-Z-で示される上記のジペプチド残基からなるスペーサー又は該ジペプチド残基を部分ペプチド配列として含むスペーサーを用いることが好ましい。

【0019】

また、医薬化合物の残基として、一定の濃度以上で作用時間の持続を必要とする時間依存型の抗腫瘍剤を用いる場合にも、上記のスペーサーを用いることによって高い抗腫瘍効果を達成できる場合がある。このような抗腫瘍剤として、例えば、特開平6-87746号公報に記載された抗腫瘍剤、好ましくは請求項2に記載された抗腫瘍剤が挙げられる。一般的には、上記のスペーサーに限定されることなく

、抗腫瘍剤の作用機構、体内動態や毒性発現の特徴、体内での抗腫瘍剤の遊離性などの観点から好ましいスペーサーを選択する必要がある。なお、一般的に、増殖の速い癌種に対しては、短時間に高濃度の医薬化合物を遊離することができる上記のスペーサーを選択することが好ましい。

#### 【0020】

スペーサーとして利用可能なオリゴペプチドの具体例を以下の表に示すが、本発明の方法で測定対象となるDDS化合物のスペーサーは以下のものに限定されることはなく、その種類の選択は、医薬化合物の至適な遊離速度を与えるように当業者が適宜なしうることはいうまでもない（表中、ペプチド配列は左側がN末端であり、C末端側に医薬化合物の残基が結合する。D-PheはD-フェニルアラニン残基を示し、その他のアミノ酸はL-アミノ酸を示す。なお、遊離速度の大小はドキソルビシンを結合したDDS化合物のWalker 256担癌ラットに対する薬効の発現程度、またはWalker 256担癌ラットの腫瘍部位における遊離ドキソルビシン濃度によって判定した。）。これらのスペーサーのうち、ドキソルビシンに対しては（N末端）-Gly-Gly-Phe-Gly-等の短時間に高濃度の医薬化合物を遊離することができるスペーサーを用いることが好ましい。

#### 【0021】

##### 【表1】

(a) 遊離速度が大きいスペーサー

-Leu-Gly-

-Tyr-Gly-

-Phe-Gly-

-Gly-Phe-Gly-

-Gly-Gly-Phe-Gly-

-Gly-Phe-Gly-Gly-

-Phe-Gly-Gly-Gly-

-Phe-Phe-Gly-Gly-

-Gly-Gly-Gly-Phe-Gly-

(b) 遊離速度が比較的大きいスペーサー

-Gly-Gly-Phe-Phe-

-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-

(c) 遊離速度が比較的小さいスペーサー

-Phe-Phe-

-Ala-Gly-

-Pro-Gly-

-Gly-Gly-Gly-Phe-

(d) 遊離速度が小さいスペーサー

-Gly-

-D-Phe-Gly-

-Gly-Phe-

-Ser-Gly-

-Gly-Gly-

-Gly-Gly-Gly-

-Gly-Gly-Gly-Gly-

【0022】

DDS化合物を構成する高分子キャリアーとしては、例えば、多糖誘導体のほか、合成高分子などを用いることができる。多糖誘導体及び合成高分子としては、生体に対して実質的に毒性を示さず、薬物担体として作用できるものであればいかなるものを用いてもよい。例えば、DDS化合物の製造に従来より用いられている多糖誘導体及び合成高分子はいずれも高分子キャリアーとして利用可能である。例えば、カルボキシル基を有する多糖誘導体を好適に使用でき、ポリアルコール化多糖誘導体は特に好適に使用できる。また、合成高分子としては、例えば、ポリエチレングリコール類；ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、若しくはポリリジンなどのポリアミノ酸類；またはN-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド誘導体などのポリビニル化合物の誘導体を挙げることもできる。

【0023】

より具体的には、カルボキシル基を有する多糖誘導体としては、例えば、多糖類又はそれらを化学的若しくは生物学的に修飾した誘導体を用いることができ、好

ましくは分子中にカルボキシル基を有するものを用いることができる。分子中にカルボキシル基を有する高分子キャリアーの例としては、ヒアルロン酸、ペクチン酸、アルギン酸、コンドロイチン、ヘパリンなどの多糖類のほか、プルラン、デキストラン、マンナン、キチン、イヌリン、レバン、キシラン、アラバン、マンノグルカン、キトサンなどの多糖の一部又は全部の水酸基に対してカルボキシル基を有する官能基を導入したものなどを用いることができる。例えば、水酸基をカルボキシ $C_{1-4}$ アルキル化したものや、水酸基に多塩基酸の一のカルボキシル基をエステル結合させたものなどを好適に用いることができる。また、上記の多糖類をポリアルコール化した後に、カルボキシル基を有する官能基を導入したものを用いてもよい。

#### 【0024】

カルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールを高分子キャリアーとして用いたDDS化合物は本発明の方法の特に好適な測定対象である。カルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールのポリアルコール化度は特に限定されないが、カルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールを構成するデキストランポリアルコールが、実質的に完全にポリアルコール化可能な条件下においてデキストランを処理して得られたデキストランポリアルコールであることが好ましい。

#### 【0025】

カルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールを製造するために用いるデキストランの種類は特に限定されず、 $\alpha$ -D-1,6-結合を任意の割合で含んでいてもよい。例えば、 $\alpha$ -D-1,6-結合の割合が85%以上、90%以上、又は95%以上のデキストランなどを用いることができる。デキストランの分子量は特に限定されないが、例えば10,000程度から2,000,000程度のもの、好ましくは30,000程度から800,000程度のものを用いることができる。カルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシ $C_{1-4}$ アルキル基を構成する $C_{1-4}$ アルキルとしては、直鎖又は分枝鎖の $C_{1-4}$ アルキル、具体的にはメチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基などを用いることができるが、好ましくはメチル基を用いることができる。

## 【0026】

出発原料としてデキストランを用いる場合には、デキストランに大過剰の過ヨウ素酸ナトリウムと水素化ホウ素ナトリウムとを順次作用させてデキストランを実質的に完全にポリアルコール化したデキストランポリアルコールを製造することができる。もっとも、デキストランのポリアルコール化の方法は上記のものに限定されることはなく、当業者に利用可能なものであればいかなる方法を採用してもよい。カルボキシ $C_{1-4}$ アルキル化は、例えば、デキストランポリアルコールの水酸基に対してクロル酢酸、ブロム酢酸、 $\alpha$ -クロルプロピオン酸、 $\alpha$ -メチル- $\alpha$ -クロルプロピオン酸、 $\beta$ -クロルプロピオン酸、 $\alpha$ -メチル- $\beta$ -クロルプロピオン酸、 $\alpha$ -クロル酪酸、 $\beta$ -クロル酪酸、 $\gamma$ -クロル酪酸などのハロゲン化 $C_{1-4}$ アルキルカルボン酸、好ましくはクロル酢酸を反応させて水酸基を部分的又は完全にカルボキシ $C_{1-4}$ アルキル化することにより行うことができる。

## 【0027】

例えば、デキストランポリアルコールを反応に関与しない不活性溶媒（例えば、水、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド等）に溶解し、塩基（例えば、水酸化ナトリウムや水酸化カリウム等）の存在下にハロゲン化 $C_{1-4}$ アルキルカルボン酸またはその塩を添加し、氷冷下ないし100℃程度の温度範囲で数分ないし数日間反応させればよい。カルボキシ $C_{1-4}$ アルキル基の導入の程度は、例えば、カルボキシ $C_{1-4}$ アルキル化の反応温度や試薬として用いるハロゲン化 $C_{1-4}$ アルキルカルボン酸及び塩基の量を適宜選択することにより容易に調節可能であり、そのような手段は当業者に周知である。デキストランポリアルコールの糖残基に対するカルボキシ $C_{1-4}$ アルキル化の程度は特に限定されないが、例えば、0.01~2.0の範囲、好ましくは0.1~1.0の範囲である。

## 【0028】

また、高分子キャリアーとして糖化合物で修飾された高分子キャリアーを用いたDDS化合物も本発明の測定方法の好適な対象である。例えば、糖化合物で修飾されたカルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールなどを高分子キャリアーとして好適に用いることができる。高分子キャリアーを修飾する糖化合物の種類は特に限定されず、DDS化合物が指向すべき臓器の種類や体内動態などの



条件に応じて当業者が適宜選択可能である。糖化合物としては単糖類若しくはオリゴ糖類、又はそれらの誘導体のいずれを用いてもよい。また、糖化合物と高分子キャリアーとの結合の種類は特に限定されない。

#### 【0029】

糖化合物と高分子キャリアーとが、例えば、 $0-\alpha$ -グリコシド結合又は $0-\beta$ -グリコシド結合などにより直接結合していてもよく、あるいは適宜のリンカーを介して両者が結合していてもよい。本明細書において用いられる「リンカー」という用語は、糖化合物残基と高分子キャリアーとの結合に用いられるいかなるものも包含するように、最も広義に解釈する必要がある。高分子キャリアーに対する糖化合物の導用量（置換度）は特に限定されず、糖化合物の種類、所望の指向性の程度、医薬化合物の種類など種々の条件によって適宜選択可能であるが、例えば、高分子キャリアーとしてカルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールを用いる場合には、一般的には、カルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールの糖残基あたり0.01-1.0程度である。

#### 【0030】

高分子キャリアーと糖化合物との結合にリンカーを用いる場合、リンカーの種類は特に限定されないが、例えば、 $-O-(CH_2)_n-NH-$ （ $n$ は1～16の整数）又は $-(O-CH_2CH_2)_m-NH-$ （ $m$ は1～10の整数）で表されるリンカーを利用することが好ましい。高分子キャリアーとしてカルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールを用いる場合には、これらのリンカーの0末端又はN末端、好ましくは0末端を糖化合物に $0-\alpha$ -グリコシド結合又は $0-\beta$ -グリコシド結合で結合し、他端をカルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とアミド結合又はエステル結合させることにより、カルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールを糖化合物で修飾することが可能である。

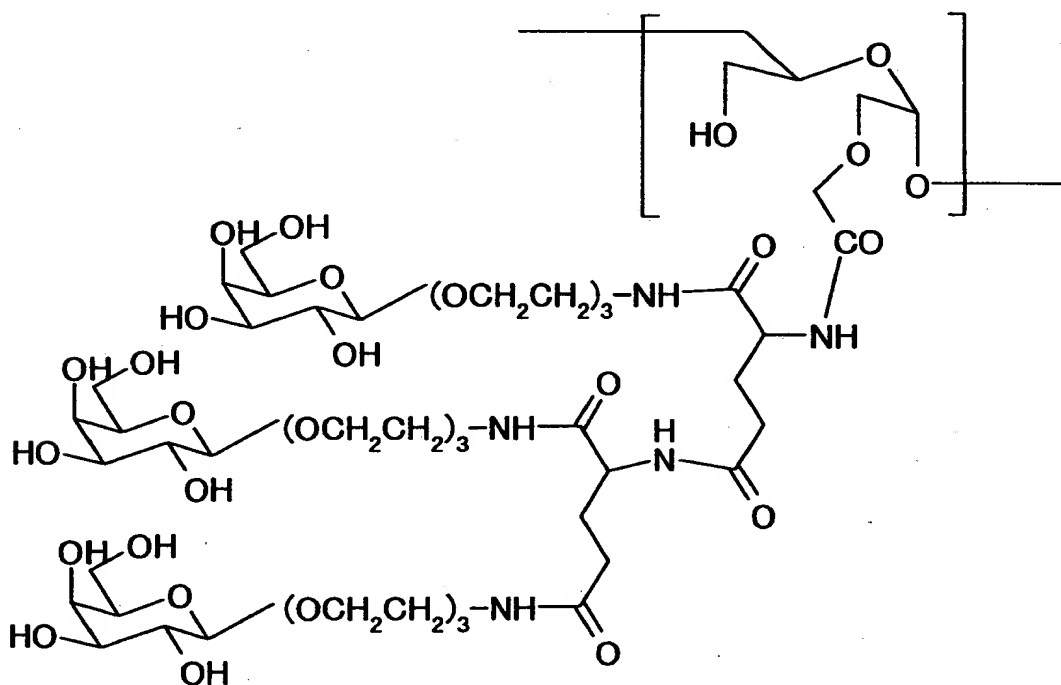
#### 【0031】

また、本発明の測定方法の対象は、いわゆるクラスター修飾に適するリンカーを用いて製造されたDDS化合物（いわゆるクラスター修飾体）であってもよい。クラスター修飾体は、高分子キャリアーの反応性官能基（例えばカルボキシル基）に対してクラスター修飾に適するリンカーを用いて糖化合物を房状に結合させ

た化合物であり、その具体的手段は、例えば、特許第2774417号明細書、特許第2774429号明細書、又はBiol. Pharm. Bull., 20, pp.259-266, 1997などに記載されている。クラスター修飾体は複数個の糖化合物を一定の空間内に配置するために、レセプターとの親和性が高まり、優れた臓器指向性を発揮できるという特徴がある。クラスター修飾されたDDS化合物の一例を下記に示す（下記の構造式では、クラスター修飾されたカルボキシC<sub>1-4</sub>アルキルデキストランポリアルコール分子の部分構造を示してあり、医薬化合物の残基は省略してある）。もっとも、DDS化合物に利用可能なクラスター修飾方法は下記の具体例に限定されることなく、当業者が適宜の手段を選択できることは言うまでもない。

【0032】

【化1】



【0033】

高分子キャリアーの修飾に用いる単糖類としては、グルコース、フルクトース、マンノース、ガラクトース、フコース、ノイラミン酸、ウロン酸などのヘキソース；ガラクトサミン、グルコサミンなどのヘキソサミン；リボース、デオキシリボース、アラビノース、キシロースなどのペントースなどを挙げることができる。これらの誘導体として、例えば、N-又はO-アシル誘導体、O-アルキル誘導体、

硫酸エステル、リン酸エステルなどを用いてもよい。単糖類の誘導体として、より具体的には、N-アセチルノイラミン酸、N-アセチルガラクトサミン、N-アセチルグルコサミン、マンノース-6-リン酸、ガラクトース-3-リン酸、6-0-ベンゾイルグルコース、6-0-カルボキシメチル-N-アセチルグルコサミン、2-N-ベンジルグルコサミンなどを挙げることができる。オリゴ糖類としては、例えば、上記の単糖類又はそれらの誘導体から構成される直鎖状又は分枝鎖状のヘテロオリゴ糖又はホモオリゴ糖を用いることができる。より具体的には、蔗糖、シアリルルイスA、シアリルルイスX、ラクトース、マルトース、ルイスX、硫酸化ルイスXなどを用いることができる。これらのうち、肝臓指向性を高める糖化合物としては、ガラクトース若しくはN-アセチルガラクトサミン又はその誘導体、あるいはガラクトース又はN-アセチルガラクトサミンを非還元末端側に有するオリゴ糖（例えばラクトース）が好ましく、特にガラクトース又はN-アセチルガラクトサミンが好ましい。

#### 【0034】

本発明の方法は、上記のDDS化合物を測定するにあたり、DDS化合物にペプチダーゼを作用させて得られる加水分解物を測定することの特徴としている。ペプチダーゼとしては、DDS化合物のスペーサーに含まれるオリゴペプチド部分（2～8個のアミノ酸がペプチド結合したオリゴペプチド部分）を加水分解することができるものであれば、その種類は特に限定されない。例えば、スブチリシン、 $\alpha$ -キモトリプシン、タイプIVコラゲナーゼ、ペプシン、サーモリシン、パパン、エラスターゼなどを用いることができるが、これらのうち、 $\alpha$ -キモトリプシンが好ましい。

#### 【0035】

加水分解物の種類は特に限定されないが、紫外線吸収スペクトル、蛍光スペクトルなどの通常の分光学的手法により検出可能であることが望ましい。通常は、加水分解物として、医薬化合物自体のほか、スペーサーの一部が残存して医薬化合物残基に結合している化合物、例えばスペーサー由来の1個のアミノ酸が結合した医薬化合物、スペーサー由来の2～8個のアミノ酸からなるオリゴペプチドが結合した医薬化合物、又は-NH-Y-CO-（式中、Yは炭素数1～8のアルキレン基又は

フェニレン基などの連結基を示す)で表される連結基を介してスパーサー由来の1個のアミノ酸若しくは上記オリゴペプチドが結合した医薬化合物などを測定することができる。また、上記の加水分解物においては、医薬化合物の反応性官能基の一部又は全部が加水分解を受けていてもよい。DDS化合物の種類に応じて適宜のペプチダーゼを選択することにより、所望の加水分解物を測定することが可能になる。

#### 【0036】

測定のための試料としては、DDS化合物を投与した動物(ヒトを含む)から分離された血液、リンパ液、唾液、尿、糞、摘出組織などの生体試料のほか、DDS化合物の水溶液、又は実質的に酵素反応を阻害しない水性有機溶媒の溶液などを用いることができる。各種のペプチダーゼについて好適な反応条件が当業界で知られており、当業者は、ペプチダーゼの種類に応じて適宜の反応条件、例えば、基質濃度、pH、緩衝液、反応温度、反応時間などを容易に選択することができる。通常は、上記の試料を必要に応じてホモジュネートや脱蛋白質などの前処理に付した後、DDS化合物が所望の基質濃度となるように希釈した反応液にペプチダーゼを添加し、DDS化合物が完全に加水分解されるまで反応を継続すればよい。

#### 【0037】

加水分解物を測定する方法は特に限定されないが、DDS化合物の定量、又は医薬化合物の導入量の定量を行う場合には、加水分解物の性質に応じて、紫外線吸収スペクトル測定、蛍光スペクトル測定など、通常分光学的手法を単独で又は複数組み合わせる用いることが望ましい。また、高速液体クロマトグラフィーなどの分離操作を適宜組み合わせる測定を行ってもよい。予め測定系において検量線を作成することにより、精度よく定量を行うことが可能になる。なお、本明細書の実施例には、本発明の方法の代表例が具体的かつ詳細に説明されているので、当業者は、上記の一般的説明及び実施例の具体的説明に基づいて、必要に応じてそれらに適宜の改変ないし修飾を加えることにより、本発明の方法を容易に実施できる。

#### 【0038】

## 【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

## 【0039】

## 例 1

高分子キャリアーであるカルボキシメチルデキストランポリアルコール（以下CM-Dex-PAと略す）と抗腫瘍剤（特開平6-87746号公報の請求項2に記載された(1S, 9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン：以下、実施例においてDX-8951と略す。）とが、(N末端)-Gly-Gly-Phe-Gly-で表されるテトラペプチドスペーサーを介して結合したDDS化合物(化合物1)を、国際公開W097/46260号の実施例15に記載の方法に準じて製造した。CM-Dex-PAとしては、平均分子量228K、カルボキシメチル化度（構成糖残基あたりのカルボキシメチル基の置換度）0.4のものを用いた。

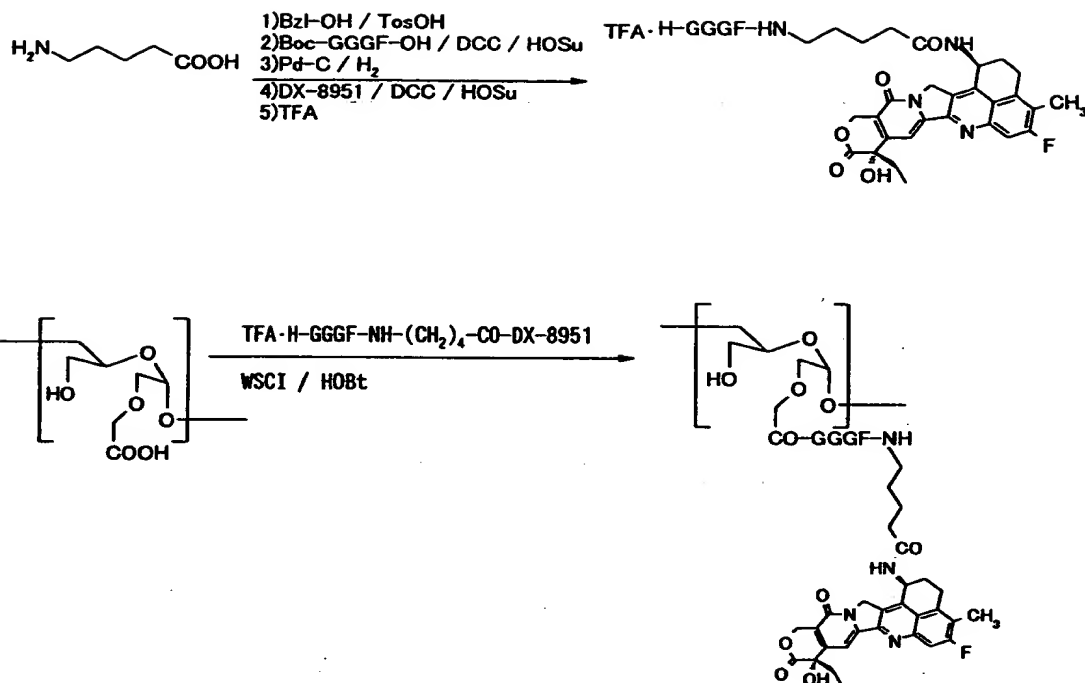
## 【0040】

蒸留水にて400  $\mu\text{g/ml}$  に調製した上記DDS化合物10  $\mu\text{l}$ を180  $\mu\text{l}$ のBritton Robinson 緩衝液 (pH6.0) に添加し、さらに蒸留水で 10mg/ml に調製した  $\alpha$ -キモトリプシン溶液を 10  $\mu\text{l}$  添加した。反応液を40℃で2時間インキュベートした後、50%のアセトニトリルを含有した 0.5 N HCl 溶液を 200  $\mu\text{l}$  加え、遊離した加水分解物（スペーサー由来のグリシンがDX-8951のアミノ基にペプチド結合した化合物：国際公開W097/46260号の実施例50に記載の化合物、以下、G-DX-8951と略す）をHPLCにて定量した。HPLC測定は、Symmetry C18 (4.6×100 mm; 3.5  $\mu\text{m}$ , Waters 社) カラムを用い、有機溶媒（メタノール：アセトニトリル=1：2）を36.5% 含有する 0.1M 酢酸ナトリウム(pH5.0)にて溶出を行い、蛍光スペクトル測定 (Ex.375 nm 及び Em.445 nm) により加水分解物を検出した。この結果、上記DDS化合物の DX-8951 含有量は5.7% であった。一方、DX-8951のUV 吸収 (366 nm) を指標とし、分光光度計を用いて上記DDS化合物の DX-8951 含有量を算出したところ4.9% であった。

## 【0041】

## 例 2

## 【化 2】



## 【0042】

CM-Dex-PAとDX-8951とが(N末端)-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CO-で表されるスペーサーを介して結合したDDS化合物(化合物2)を下記のようにして製造した。5-アミノペンタノイックアシッド(1.0 g)とp-トルエンスルホン酸(1.95 g)とベンジルアルコール(5 ml)をトルエン(50 ml)中、140℃でDean-Starkを用いて、生成する水を除去しながら5時間反応させた。反応液を濃縮し、得られた残さにエーテルを加えて固化した。得られた固体を濾過し、エーテルで洗浄して乾燥させ、5-アミノペンタノイックアシッドベンジルエステルのトシル酸塩を2.9g得た。

## 【0043】

Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-OH (575 mg)、HOSu (182 mg)、及びDCC (326 mg)をDMF (20 ml)に溶解し、30分間攪拌した。この溶液に5-アミノペンタノイックアシッドベンジルエステルのトシル酸塩 (500 mg)とトリエチルアミン (0.184 ml)をDMF (10 ml)に溶かした溶液を加え、室温で3日間攪拌した。反応液を濃縮し、残査

をカラムクロマトグラフィ ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}=20:1$ )で精製し、Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-( $\text{CH}_2$ )<sub>4</sub>-COOBzlを380 mg得た (Bzlはベンジル基を示す)。Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-( $\text{CH}_2$ )<sub>4</sub>-COOBzl (380 mg)を50% 含水メタノール (20 ml) に溶かし、5% Pd-C (50% 含水) (300 mg)を加え、水素常圧下、1晩攪拌した。反応液中の触媒を濾去し、濃縮乾固し、Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-( $\text{CH}_2$ )<sub>4</sub>-COOHを330 mg得た。

## 【0044】

Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-( $\text{CH}_2$ )<sub>4</sub>-COOH (150 mg) とDCC (70 mg) と HOSu (40 mg) をDMFに溶かし、30分攪拌した。この溶液に、DX-8951 (160 mg) とトリエチルアミン (0.040 ml) をDMFに溶かした溶液を加え、室温で1晩攪拌した。反応液を濃縮し、得られた残渣をカラムクロマトグラフィ ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}=20:1$ ) で精製して、Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-( $\text{CH}_2$ )<sub>4</sub>-CO-DX-8951 を 110 mg 得た。Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-( $\text{CH}_2$ )<sub>4</sub>-CO-DX-8951 (110 mg) をTFA (2 ml) に溶かし、1時間反応させた後、反応液を濃縮し、得られた残渣にエーテルを加え固化させた。上澄みを除去し、固体を乾燥し、H-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-( $\text{CH}_2$ )<sub>4</sub>-CO-DX-8951のトリフルオロ酢酸塩を100mg得た。

<sup>1</sup>H-n.m.r. (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 8.45-8.55 (m, 2H), 8.28-8.35 (m, 2H), 7.95-8.10 (br, 2H), 7.79 (d, 1H, J=10.7Hz), 7.70-7.75 (m, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.20-7.30 (m, 5H), 7.15-7.25 (m, 4H), 6.50-6.60 (br, 1H), 5.50-5.60 (m, 1H), 5.40-5.50 (m, 2H), 5.18 (s, 2H), 4.50-4.60 (m, 1H), 3.55-3.95 (m, 7H), 3.00-3.25 (m, 5H), 2.75-2.85 (m, 1H), 2.50 (s, 3H), 2.15-2.25 (m, 4H), 1.86-2.00 (m, 2H), 1.55-1.65 (m, 2H), 1.45-1.55 (m, 2H), 0.88 (t, 3H, J=7.35Hz)

## 【0045】

特願平8-144421号公報の実施例13に記載の方法に準じて製造した平均分子量337K、カルボキシメチル化度(構成糖残基あたりのカルボキシメチル基の置換度) 0.4のCM-Dex-PA(350mg)を水(10ml)に溶解した。この溶液に、H-GGGF-NH-( $\text{CH}_2$ )<sub>4</sub>-CO-DX-8951のトリフルオロ酢酸塩 (50 mg) をメタノール (10 ml) に溶かした溶液を加え、さらに、HOBt (7 mg) をメタノール (5 ml) に溶かした溶液を加えた。反応液のpHを7.0に調整して水溶性カルボジイミド(10mg)を加え、14時間攪拌した。さらに、水溶性カルボジイミド(10mg)を加え、2時間攪拌後に、水溶性カル

ボジイミド(10mg)を加え、2時間攪拌した。反応液を超純水で希釈し、限外ろ過膜(50K)を用いて低分子を除去し、凍結乾燥し、得られた粉体を3M食塩水に溶かし、エタノールに滴下し、析出した固体を遠心分離によって分離した。上澄みを除去し、固体を再度水に溶解し、限外濾過膜(50K)で低分子を除去した後、0.22 $\mu$ mのフィルターを通して凍結乾燥し、目的物を280mg得た。

## 【0046】

蒸留水にて 2.63 mg/ml に調製した上記DDS化合物の溶液10 $\mu$ l に Britton Robinson 緩衝液(pH 6)にて 2 mg/ml に調製した  $\alpha$ -キモトリプシン溶液、又はTris-HCl(pH 9)にて 2 mg/ml に調製したサブチリシンA溶液を 490 $\mu$ l 添加した。この反応液を40℃で2時間インキュベートした後、50%のアセトニトリルを含有した 0.5 N HCl 溶液を500 $\mu$ l 加え、遊離した加水分解物[NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CO-DX-8951]を HPLCにて定量した。HPLC測定は、Symmetry C18 (4.6 $\times$ 100 mm; 3.5  $\mu$ m, Waters 社) カラムを用い、有機溶媒(メタノール:アセトニトリル=1:2)を 32% 含有する 0.1% トリフルオロ酢酸溶液で溶出を行い、蛍光スペクトル測定(Ex.375 nm 及び Em.445 nm)により加水分解物を検出した。この結果、NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CO-DX-8951 は約4.8分に溶出された。NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CO-DX-8951 を検量線に用いて上記DDS化合物中のDX-8951含有量を算出したところ3.2%と算出された。一方、DX-8951を検量線として上記DDS化合物のUV吸収からDX-8951含有量を算出した場合には2.9%と算出された。

## 【0047】

## 例3

①サブチリシンA (0.1 M Tris-HCl pH 9.0) ② $\alpha$ -キモトリプシン (0.1 M Tris-HCl pH 8.0)、③サーモリシン(0.1 M Tris-HCl/1 mM CaCl<sub>2</sub> pH 9.0)を用いて、例1で製造したDDS化合物(化合物1)のDX-8951含有量を測定した。各酵素用の緩衝液180 $\mu$ lに 400  $\mu$ g/ml に調製した化合物1を 10 $\mu$ l 添加した(最終濃度:20  $\mu$ g/ml)。この混合物に各緩衝液で100 mg/ml に調製した各酵素を 10 $\mu$ l 添加した後(最終濃度:5 mg/ml)、40℃で3時間反応させた。反応後、50%アセトニトリルを含有する 0.5 N HCl 溶液を200 $\mu$ l 添加し、その 10 $\mu$ l を HPLC で分析した。Symmetry C18 (4.6 $\times$ 250 mm) カラムを用い、有機溶媒(アセ



トニトリル：メタノール=2:1) を 31% 含有する 0.1 M AcONa 緩衝液 pH 5.0 で溶出した。蛍光スペクトル測定 (Ex. 375 nm 及び Em. 445 nm) により加水分解物を測定し、G-DX-8951、DX-8951、及び化合物 1 からスパーサー由来のフェニルアラニン-グリシンが結合した DX-8951 (FG-DX-8951) をそれぞれ 2 nmol/ml 含有する溶液を用いて作成した検量線により酵素反応溶液中の加水分解物を定量した。この結果、サブチリシン A と  $\alpha$ -キモトリプシンは上記条件によりそれぞれ化合物 1 から G-DX8951 を 100% 遊離した。また、サーモリシンは FG-DX-8951 を 100% 遊離した。

## 【0048】

## 例 4

腹腔内にて継代維持した Meth A 細胞 ( $1 \times 10^6$  cells/mouse) を BALB/c(♂) マウスに腹腔内移植し、5 日後に化合物 1 (DX-8951 含有量: 5.2%) を 10 及び 2.5 mg/kg (DX-8951 換算量) で腹腔内投与した。投与後、経時的 (2、4、8、24、及び 48 時間) に心採血し、10 分放置した後、12,000 rpm で 10 分間遠心分離して血清を得た。さらに、その時の癌性腹水を採取した。血清及び癌性腹水 25  $\mu$ l に 80% メタノール水を 100  $\mu$ l 添加した後、12,000 rpm で 5 分間遠心分離し、その上清の 25  $\mu$ l に 0.1 M Tris-HCl pH 8.5/0.1 M  $\text{CaCl}_2$  を用いて 2 mg/ml に調製したサーモリシン溶液を 225  $\mu$ l 添加し、50°C で 1 時間反応した。その後、50% アセトニトリル含有 0.5 N HCl を 250  $\mu$ l 添加し、その 20  $\mu$ l を HPLC 分析した。カラムとして Symmetry C18 (4.6  $\times$  100 mm) を使い、メタノールとアセトニトリルの混液 (1:2) を 41% 含む 0.1 M AcONa (pH 5) 溶液にて溶出し、蛍光スペクトル測定 (Ex. 375 nm、Em. 445 nm) により加水分解物を検出した。その結果、10 mg/kg 投与では、腹水中の化合物 1 の濃度は時間の経過とともに減少したが、血中濃度は投与後次第に上昇して 24 時間で最大値となり、その後、腹水濃度とほぼ同程度に推移した (図 1)。2.5 mg/kg 投与時の腹水及び血中濃度の推移は 10 mg/kg の場合と同様であった。

## 【0049】

## 例 5

腹腔内にて継代維持した Meth A 細胞 ( $1 \times 10^6$  cells/mouse) を BALB/c(♂) マ

ウスに腹腔内移植し、5 日後に化合物 1 (DX-8951 含有量: 6.6%) を 10 及び 2.5 mg/kg (DX-8951 換算量) で静脈内投与した (1 群 3 匹)。投与後、経時的 (5 分、30 分、2、4、8、24、及び 48 時間) に心採血し、10 分放置した後、12,000 rpm、10 分間遠心分離して血清を得た。さらに、その時の癌性腹水を採取した。血清及び癌性腹水 25  $\mu$ l に Britton Robinson Buffer (pH 6) を用いて 2 mg/ml に調製した  $\alpha$ -キモトリプシン溶液を 225  $\mu$ l 添加し、40℃ で 2 時間反応した。その後、50% アセトニトリル含有 0.5 N HCl を 250  $\mu$ l 添加し、12,000 rpm、5 分間遠心分離し、その上清の 10  $\mu$ l を HPLC 分析した。HPLC 分析で得られた G-DX-8951 濃度、及び用いた化合物 1 の DX-8951 含有量から推定される化合物 1 の濃度を算出した。HPLC 分析は例 4 の条件に従って行った。この結果、10 mg/kg 投与時には、血中の化合物 1 濃度は時間の経過とともに減少した。腹水での化合物 1 の濃度は投与後次第に上昇し、48 時間で血中濃度とほぼ同程度になった (図 2)。2.5 mg/kg 投与時における化合物 1 の腹水中及び血中の濃度推移は、10 mg/kg の場合と同様であった。

【0050】

#### 例 6

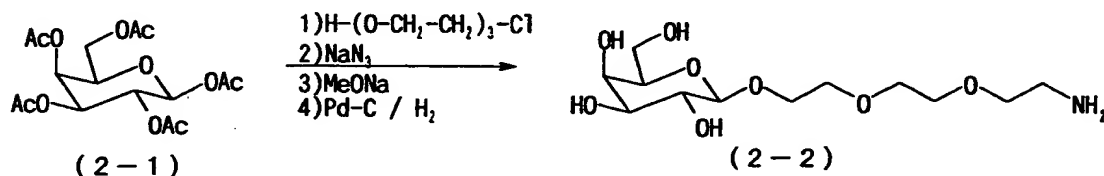
糖化合物で修飾された高分子キャリアーを有する DDS 化合物を以下のようにして製造した。下記のスキームにおいて、糖鎖の構成単位としてカルボキシメチル基が導入された 1 個又は 2 個の構成単位を例示的に記載したが、実施例に記載した DDS 化合物のカルボキシメチルデキストランポリアルコール部分は、上記構成単位の繰り返しによって構成されるものではないことを理解すべきである。また、カルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度 (構成糖残基あたりのカルボキシメチル基の置換度) は、カルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩を遊離酸型に変換した後、0.1N 水酸化ナトリウム水溶液に溶解して 0.1N 塩酸で滴定することにより求めた。カルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩の水溶液を Bio-Rad AG50W-x 2 ( $H^+$ ) カラムに付して通過液を凍結乾燥して試料として用いた。この試料を所定過剰量の 0.1N 水酸化ナトリウム水溶液に溶解し、フェノールフタレンを指示薬として 0.1N 塩酸で滴定した。試料の採取量を s(mg)、0.1N 水酸化ナトリウム

水溶液の所定過剰量を  $a(\text{ml})$ 、 $0.1\text{N}$  塩酸の滴定量を  $b(\text{ml})$  とし、カルボキシメチル化度を  $13.4(a-b)/[s-5.8(a-b)]$  の式により求めた。また、薬物の導入量(重量%)は、薬物の特性吸収を利用した吸光度分析(362 nm付近)から求めた。さらに、ゲル濾過法は次の条件に従って行った(カラム: TSK gel G4000 PW<sub>XL</sub>、溶離液:  $0.1\text{M}$  NaCl、流速:  $0.8\text{ ml/min}$ 、カラム温度:  $40^\circ\text{C}$ )。

【0051】

(A) 化合物2-2の合成

【化3】



【0052】

化合物2-1 (5.0 g)と2-[2-(2-クロロエトキシ)エトキシ]エタノール(3.75 ml)をジクロロメタン(75 ml)に溶かし、3フッ化ホウ素エーテル錯体(7.7 g)を加え、5時間攪拌した。反応液をジクロロメタン(100 ml)で希釈し、有機層を水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、食塩水で洗い、硫酸マグネシウムで乾燥し、硫酸マグネシウムを濾去した後、溶媒を留去し、得られた残渣をシリカゲルを用いるカラムクロマトグラフィー(ヘキサン:酢酸エチル2:1)で精製し、クロル体を3.3g得た。得られたクロル体(3.3 g)と $\text{NaN}_3$ (2.0 g)をDMF(15 ml)中で $60^\circ\text{C}$ で2日間攪拌した。溶媒を留去し、酢酸エチルと水の混合液に溶かし、有機層を水洗し、硫酸マグネシウムで乾燥し、硫酸マグネシウムを濾去し、溶媒を留去し、アジド体を2.8g得た。

【0053】

得られたアジド体(1.5 g)をメタノール(30 ml)に溶かし、溶液のpHが10になるまで、28% MeONa含有メタノール溶液を加え、1時間攪拌した。反応液にDowex 50W X8( $\text{H}^+$ )を溶液の液性が中性になるまで加え、樹脂を濾去し、溶媒を留去した。得られた残渣をメタノール(50 ml)と水(10 ml)の混合液に溶かし、5%Pd-C(50%含水

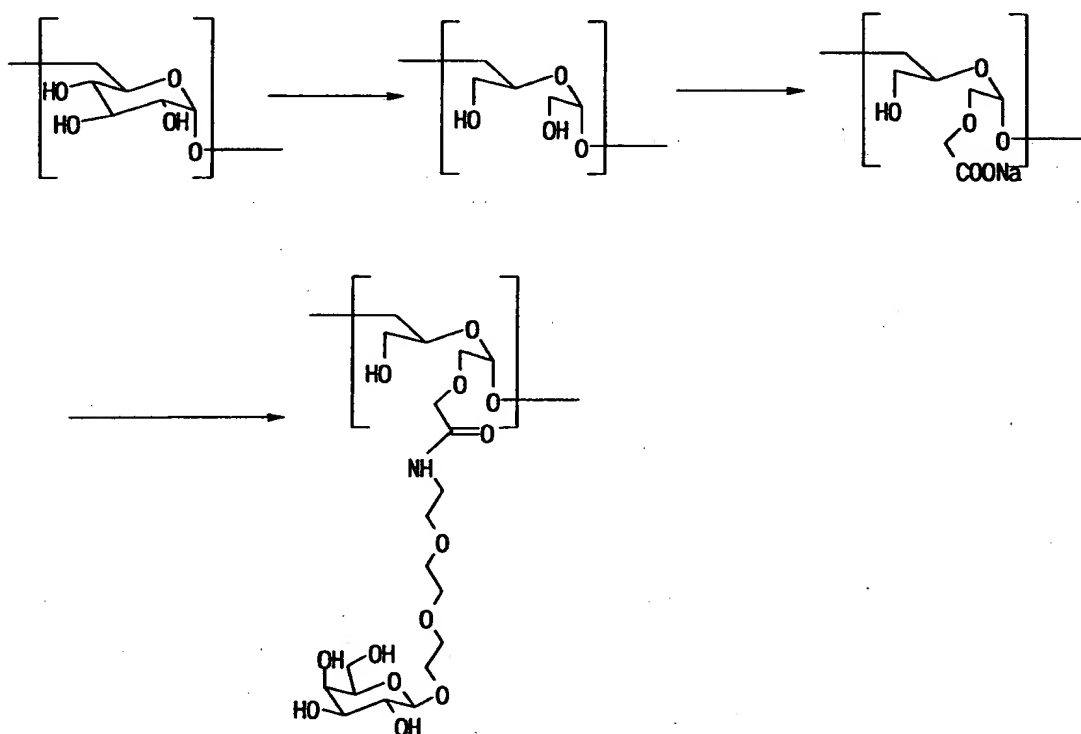
) (2.0 g) を加え、水素常圧下 1 晩攪拌した。触媒を濾去し、溶媒を留去し、化合物 2-2 を 1.2 g 得た。

$^1\text{H-n.m.r. (DMSO-d}_6\text{)}$ :  $\delta$  4.20-4.30 (1H, br), 4.00-4.10 (1H, br), 3.80-3.85 (1H, br), 3.50-3.75 (14H, m), 2.75-2.90 (2H, m)

【0054】

(B) ガラクトース修飾CMデキストランポリアルコールの合成

【化4】



【0055】

デキストラン4(フナコシ社製、平均分子量4000-6000)(20 g)の0.1M 酢酸緩衝液(pH5.5)(2000 ml)に、過ヨウ素酸ナトリウム(66.0 g)の水溶液(2000 ml)を加えた。遮光して4℃で10日間攪拌後、エチレングリコール(14.0 ml)を加え、一晩攪拌した。反応液を氷冷下で8M水酸化ナトリウム水溶液を用いてpHを7.5に調整した後、水素化ホウ素ナトリウム(28 g)を加えた。溶解後、室温で一晩攪拌した。氷冷して、酢酸でpH5.5に調整し、4℃で1時間攪拌した。氷冷下で8M水酸化ナトリウム水溶液を用いてpHを7.5に調整した。以上の行程を2回行い、得られた2つ

の水溶液を1つにまとめ、バイオマックス-3膜(ミリポア社製)を用いた限外濾過法による低分子画分の除去を行ない残留溶液を得た。この残留溶液をバイオマックス-30膜を通過させた。通過した溶液をバイオマックス-3膜を用いた限外濾過法により脱塩した後、凍結乾燥して精製デキストランポリアルコール(12.0 g)を得た。この物質の分子量(ゲル濾過、プルラン標準)は、9Kであった。

## 【0056】

水酸化ナトリウム(39.3 g)を水(282 ml)に溶かして得られる水溶液に上記の精製デキストランポリアルコール(9.4 g)を加え、室温で溶解させた。この溶液に氷冷下でモノクロル酢酸(56.4 g)を加えて溶解させた後室温で20時間反応させた。この反応液を酢酸でpHを8に調整した後、バイオマックス-5膜を用いた限外濾過法による低分子画分の除去を行なった。残留溶液を凍結乾燥して、カルボキシメチル(以下、CMと略す)デキストランポリアルコールのナトリウム塩(12 g)を得た。得られたCMデキストランポリアルコールのナトリウム塩(4.0 g)を、水酸化ナトリウム(17 g)を水(120 ml)に溶かして得られる水溶液に加え、室温で溶解させた。この溶液に氷冷下でモノクロル酢酸(24 g)を加えて溶解させた後室温で20時間反応させた。

## 【0057】

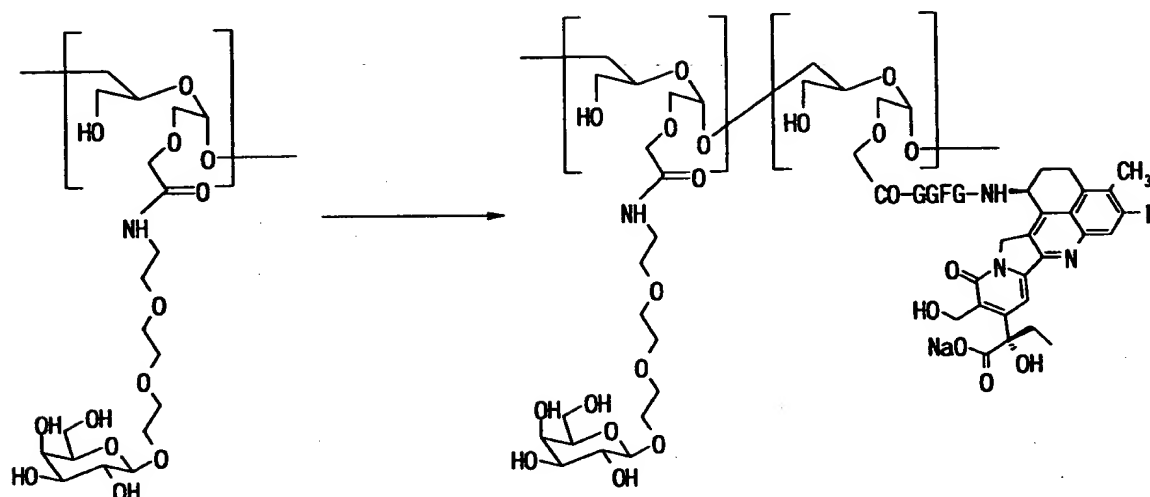
この反応液を酢酸でpHを8に調整した後、バイオマックス-5膜を用いた限外濾過法による低分子画分の除去を行なった。残留溶液を凍結乾燥して、CMデキストランポリアルコールのナトリウム塩(4.0 g)を得た。この物質の分子量(ゲル濾過、プルラン標準)は、14Kであり、糖残基あたりのCM化度はアルカリ滴定から0.7であった。得られたCMデキストランポリアルコールのナトリウム塩(1.0 g)を水(100 ml)に溶解し、実施例1の化合物2-2(800 mg)のメタノール(100 ml)溶液を加えた。さらに、水溶性カルボジイミド塩酸塩(240 mg)を2時間おきに3回添加し、計6時間攪拌した。反応液中の溶媒を留去し、得られた油状物を水に溶解し、バイオマックス-3を用いた限外濾過法により脱塩した。得られた水溶液を凍結乾燥し、標記化合物を1.1 g得た。本化合物中のガラクトース含有量をフェノール-硫酸法により定量した結果、糖10残基当たり、1.0の割合であった。

## 【0058】

(C) ガラクトース修飾CMデキストランポリアルコール-Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951

の合成

【化5】



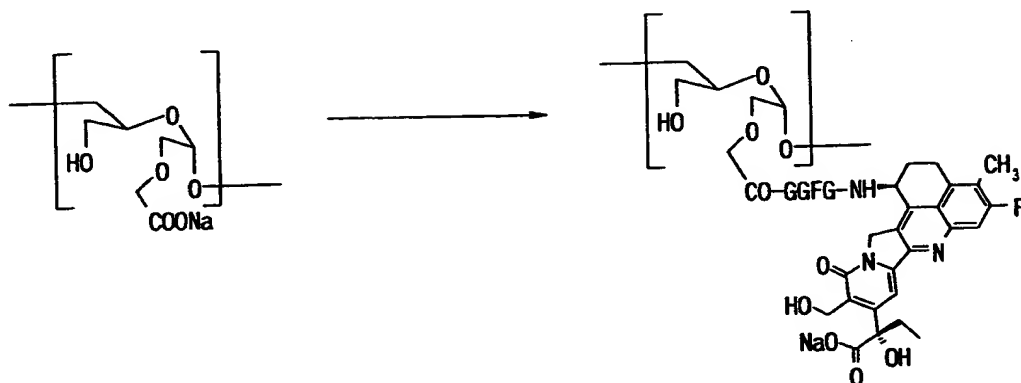
【0059】

上記(B)で得られたガラクトース修飾CMデキストランポリアルコールのナトリウム塩(1.0 g)を水(30 ml)に溶かし、3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-DX-8951のトリフルオロ酢酸塩(150 mg)と1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(35 mg)のメタノール溶液(40 ml)を加えた。溶液のpHを7.0とし、水溶性カルボジイミド塩酸塩(35 mg)を2時間ごとに、3回加えた後、1晩攪拌した。反応液中の溶媒を留去し、得られた残渣を3M塩化ナトリウム水溶液(20 ml)に溶かし、エタノール(100 ml)に滴下し、析出した沈殿を遠心分離(3500 rpm, 8分)により集めた。この沈殿を水に溶かし、バイオマックス-3膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を透過しない残留溶液をミリポアフィルター(0.22  $\mu$ m)で濾過した後、凍結乾燥して標記化合物を900mg得た。本化合物を0.1M塩化ナトリウム水溶液に溶解後、GPC(カラム: 東ソーTSK Gel PW-4000XL、溶媒: 0.1MNaCl水溶液、流速: 0.8ml/min)で分析した結果、及び本化合物の紫外線吸収スペクトル(pH9.0、0.1Mトリス緩衝液中)をそれぞれ図3及び図4に示す。本化合物中のDX-8951含有量を30%アセトニトリルを含む0.1 M トリス緩衝液 (pH 10.0) 中での366 nmにおける吸光度に基づいて定量したところ、4.9% (W/W)であった。

【0060】

(D) CMデキストランポリアルコール-Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951の合成 (参考例)

【化 6】



【0061】

上記(B)で得られたCMデキストランポリアルコールのナトリウム塩(2.0g)を水に溶解し、Dowex-50WX8( $\text{Et}_3\text{NH}^+$ )を通し、CMデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩(1.9 g)を得た。得られたCMデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩(1.9 g)を50%N,N-ジメチルホルムアミドを含む水溶液に溶解し、この溶液に、トリエチルアミン(0.112 ml)と3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-DX-8951のトリフルオロ酢酸塩(350 mg)を含むN,N-ジメチルホルムアミド(10 ml)溶液、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキシキノリン(1.9 g)を順次加え、室温で一晩攪拌しながら反応させた。反応液中の溶媒を留去し、得られた残渣を3M塩化ナトリウム水溶液(20 ml)に溶かし、エタノール(100 ml)に滴下し、析出した沈殿を遠心分離(3500 rpm)により集めた。この沈殿を水に溶かし、バイオマックス-3膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を透過しない残留溶液をミリポアフィルター(0.22  $\mu\text{m}$ )で濾過した後、凍結乾燥して標記化合物を1.4g得た。本化合物中のDX-8951含有量を30%アセトニトリルを含む0.1 M トリス緩衝液(pH 10.0)中での366 nmにおける吸光度に基づいて定量したところ、5.2% (W/W)であった。

【0062】

(E) DDS化合物の測定

上記(C)で得られたガラクトース修飾DDS化合物および対照として上記(D)のDDS化合物を注射用蒸留水にて溶解し、DX-8951に換算した濃度が0.5 mg/ml

となるように調製した。これらのDDS化合物水溶液を C57BL/6 マウスに一群 5 匹として尾静脈内に投与した。投与量は DX-8951 換算で 5 mg/kg とした。投与後、経時的 (0.5, 1, 2, 4 および 24 時間) に、肝臓を採取しこれらのDDS化合物量を求めた。得られた肝臓の重量に対し水を 5 倍量添加し、ホモジナイズした。その溶液を 3000 rpm、10 分間遠心分離し、さらに、上清を 15,000 rpm、15 分間遠心分離した。得られた上清の 50  $\mu$ l に、pH6 の Britton-Robinson Buffer (B.R.B) により 2 mg/ml に調製した  $\alpha$ -キモトリプシン溶液 450  $\mu$ l を添加し、40  $^{\circ}$ C で 2 時間反応した。その後、50% アセトニトリル含有 0.5 N HCl 溶液を 500  $\mu$ l 添加し、12,000 rpm、5 分間遠心分離し、その上清の 20  $\mu$ l を HPLC 分析し、遊離した G-DX8951 を定量することで DDS 化合物量を求めた。この時、投与に用いた各 DDS 化合物水溶液を、蒸留水により 50、10、2  $\mu$ g/ml に調製し、それぞれ 50  $\mu$ l を上述の方法により酵素処理して G-DX8951 を定量したものを検量線とした。

## 【0063】

## HPLC 分析条件

カラム: Symmetry C18 (4.6 $\times$ 100mm)

流速: 1.0 ml/min

カラム温度: 40 $^{\circ}$ C

検出波長 (蛍光): Ex. 375 nm、Em. 445 nm

溶出液: メタノール: アセトニトリル = 1 : 2 (29%) 0.1% TFA (71%)

その結果を図 5 に示す。上記のガラクトース修飾 DDS 化合物は、対象の DDS 化合物 (上記(D)) に比べて高い肝臓集積性を示した。

## 【0064】

## 【発明の効果】

本発明の方法は、DDS 化合物又は DDS 化合物に導入された医薬化合物の含有量を正確に測定することができ、しかも操作が簡便であるという特徴がある。

## 【図面の簡単な説明】

【図 1】 本発明の方法 (例 4) で測定した DDS 化合物の血中及び腹水中濃度を示した図である。



【図2】 本発明の方法（例5）で測定したDDS化合物の血中及び腹水中濃度を示した図である。

【図3】 糖化合物で修飾された高分子キャリアーを有するDDS化合物（例6）の紫外線吸収スペクトルを示す図である。

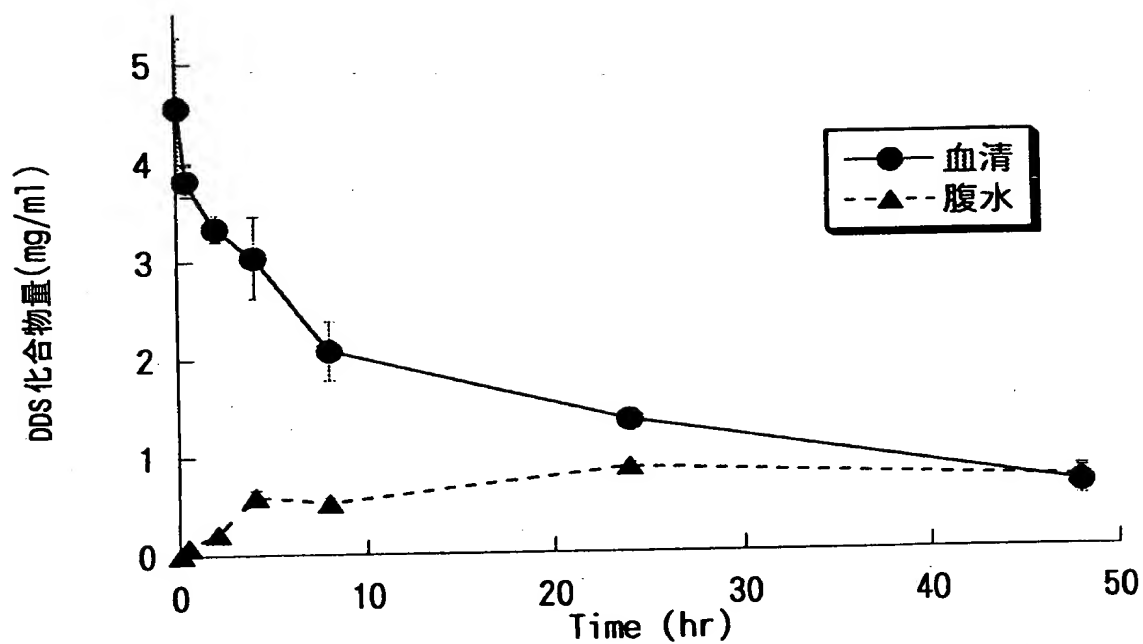
【図4】 糖化合物で修飾された高分子キャリアーを有するDDS化合物（例6）のGPCチャートを示す図である。

【図5】 例6で製造したDDS化合物（(C)及び(D)）の肝臓への集積性を示す図である。

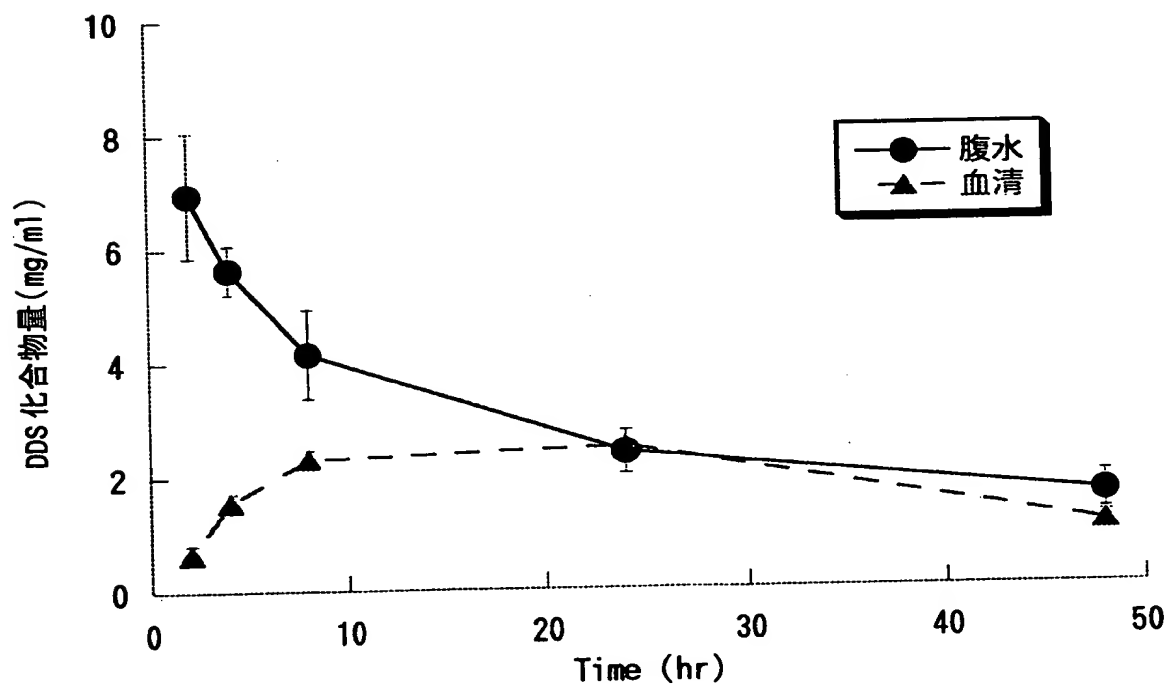
【書類名】

図面

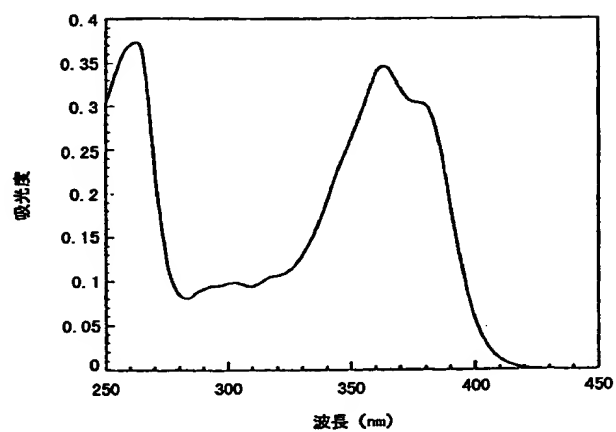
【図 1】



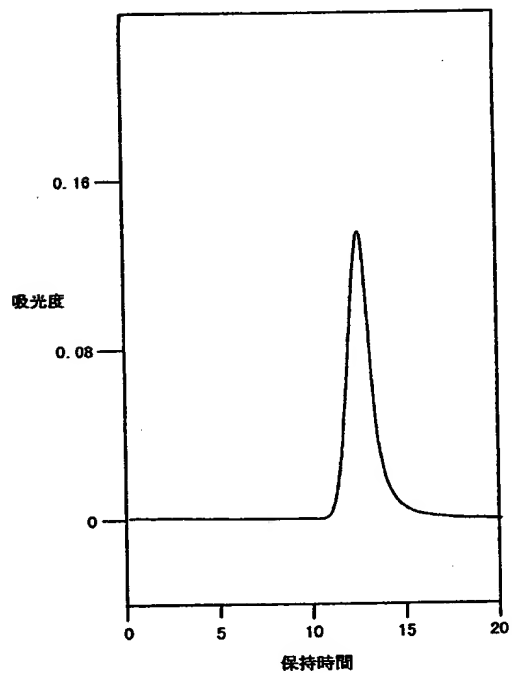
【図 2】



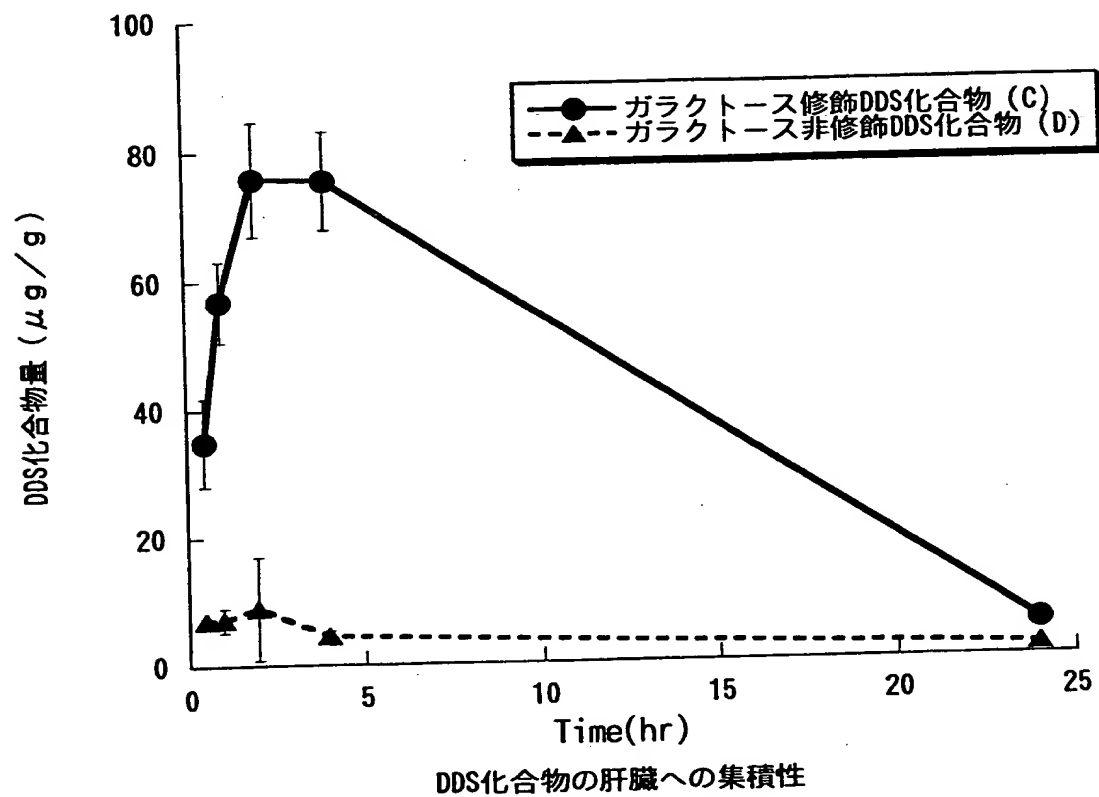
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 スペーサーを介して高分子キャリアーと医薬化合物の残基とが結合したDDS化合物を正確に定量するための測定方法を提供する。

【解決手段】 ペプチド結合した 2~8 個のアミノ酸を含むスペーサーを介してカルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールなどの高分子キャリアーと抗腫瘍剤などの医薬化合物の残基とが結合したDDS化合物の測定方法であって、該DDS化合物を $\alpha$ -キモトリプシンなどのペプチダーゼで処理することにより得られる加水分解物を測定する工程を含む方法。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000002831]

1. 変更年月日

1990年 8月28日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区日本橋3丁目14番10号

氏 名

第一製薬株式会社